基础研究

β-arrestin1 激活 JNK 信号通路促进慢性髓细胞白血病细胞 K562 增殖

陈 卉,李 康,王 毅,谭正兰,邹 琳
重庆医科大学附属儿童医院临床分子医学中心//儿童发育疾病研究教育部重点实验室//儿科学重庆市重点实验室//重庆市儿童发育重大疾病诊治与预防国际科技合作基地,四川 重庆 400014

摘要:目的 以CML K562细胞为研究对象,探索β-arrestin1促进CML细胞增殖的相关信号通路。**方法** 以β-arrestin1慢病毒载体感染CML K562细胞,形成稳定的K562-siβ1和K562-β1细胞,及非特异性siRNA对照K562-Ctrl细胞。以此为研究对象,利用细胞计数与CCK-8实验检测细胞增殖能力;Western blot检测蛋白表达;免疫共沉淀(Co-IP)实验检测蛋白间的相互作用。**结果** 细胞计数与CCK-8实验结果显示K562-β1细胞增殖与细胞存活率能力显著高于K562-Ctrl,而K562-siβ1显著低于K562-Ctrl。Western blot结果表明β-arrestin1特异性增强磷酸化JNK表达,JNK抑制剂SP600125能抑制p-JNK表达和K562细胞增殖;免疫共沉淀实验表明β-arrestin1能与Src结合。**结论** CML K562细胞中β-arrestin1与Src结合,促进JNK信号通路激活,从而促进细胞增殖。
关键词:β-arrestin1;CML;细胞增殖;JNK

β-arrestin1 promotes chronic myeloid leukemia cell proliferation by activating JNK signaling pathway

CHEN Hui, LI Kang, WANG Yi, TAN Zhenglan, ZOU Lin
Center for Clinical Molecular Medicine, Children's Hospital of Chongqing Medical University//Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders//Key Laboratory of Pediatrics in Chongqing//Chongqing International Science and Technology Cooperation Center for Child Development and Disorders, Chongqing 400014, China

Abstract: Objective To investigate the signaling pathways involved in β-arrestin1-induced proliferation of K562 cells. **Methods** We established stable cell lines K562-siβ1 and K562-β1 by lentivirus-mediated β-arrestin1 knock-down or overexpression in K562 cells, with cells transfected with non-specific siRNA as the control (K562-Ctrl). The proliferation of these cells were evaluated by cell counting and CCK-8 assays. Western blotting was used to detect the expression of JNK and p-JNK in the cells, and co-immunoprecipitation (Co-IP) assay was employed to investigate the interaction between β-arrestin1 and Src. **Results** K562-β1 cells showed significantly greater but K562-siβ1 cells had significantly lower proliferation ability and cell survival rate than K562-Ctrl cells. Western blotting showed that β-arrestin1 specifically enhanced the expression of p-JNK, and the JNK inhibitor SP600125 obviously suppressed p-JNK and cell proliferation of K562 cells. Co-IP assay revealed the binding of β-arrestin1 to Src. **Conclusions** In K562 cells, β-arrestin1 activates JNK signaling pathway by binding to Src to promote the cell proliferation.
Key words: β-arrestin1; chronic myelocytic leukemia; cell proliferation; JNK

慢性粒细胞白血病(chronic myeloid leukemia, CML)是一类发生在造血干细胞、以髓系细胞慢性增殖为主要特征的恶性克隆性疾病,占白血病新诊断病例15%~20%,年发病率为1~1.5/10万。CML随着年龄增大,发病率增加,儿童CML不足CML病例总数5%。90%以上CML患者有费城染色体(Ph),t(9;22)(q34;q11)染色体易位并形成BCR-ABL融合基因[1]。现有文献报道CML与Wnt/β-catenin、JAK/STAT、PI3K/AKT/mTOR、Hedgehog(Hh)等信号通路的异常激活密切相关[2]。

β-Arrestin1为Arrestin蛋白家族的一员,广泛存在于机体各组织与器官中。β-Arrestin1具有多重功能的信号蛋白[3],其经典功能是介导七次跨膜偶联受体(GP-CRs)脱敏和内吞[4],近年来国内外研究均发现它在肿瘤的增殖、侵袭、转移等过程中也发挥重要作用[5]。此外,Arrestin-受体复合物能以衔接蛋白的形式作用于丝裂原激活蛋白激酶(MAPK)级联反应,导致JNK3[6]、

收稿日期:2015-01-21
基金项目:国家自然科学基金(81373444)
Supported by National Natural Science Foundation of China (81373444).
作者简介:陈 卉,在读硕士研究生,E-mail: stella8848@163.com
通信作者:邹 琳,研究员,硕士生导师,E-mail: zoulin74@126.com

ERK1/2[7]和p38[8]等信号激活。

我们课题组前期的研究发现，在CML中β-arrestin1表达增高[9]，且影响其标志融合基因Bcr/Abl的H4组蛋白乙酰化，从而促进K562细胞增殖[10]，但其影响的CML相关信号通路尚未见报道。本研究以干预β-arrestin1的CML K562稳定细胞为研究对象，探讨β-arrestin1促进K562增殖的相关信号通路。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及药物

1640培养基和胎牛血清（Gibco）；CCK-8试剂（凯基公司）；anti-β-arrestin1抗体和anti-Src抗体（Abcam）；β-actin抗体（北京中衫金桥）；JNK抗体和JNK磷酸化抗体（Cell Signaling）；JNK抑制剂SP600125和MEK抑制剂PD98059（Sigma）；Src抑制剂Saracatinib（Cayman Chemical）。

1.2 细胞培养

人慢性髓细胞白血病细胞株K562由重庆医科大学附属儿童医院分子中心实验室保存。前期构建特异性敲减和过表达β-arrestin1及非特异性siRNA的慢病毒颗粒后感染K562细胞，经有限稀释法挑取单克隆细胞建立K562-Ctrl，K562-siβ1和K562-β1稳定细胞。细胞培养于含10%胎牛血清及1%青链霉素1640培养基中，置于37 ℃含5% CO_2孵箱，当细胞密度长至80%左右时传代。

1.3 细胞增殖检测

1.3.1 CCK-8检测细胞数 取对数期细胞96孔板铺板，3000/200 μl 1640全培养基每孔，铺5板，每24 h加入10 μl CCK-8试剂混匀37 ℃ 5% CO_2孵育3 h后，检测450 nm光密度（$D_{450\ nm}$），连续监测5 d。每种细胞每次设两复孔。

1.3.2 细胞计数及细胞存活率检测 每日于上述实验加入CCK-8试剂前取10 μl混匀细胞悬液与0.4%台盼蓝溶液以9:1混合混匀。取1滴混合液滴入改良牛鲍氏计数板，3 min内分别计数四个大方格内的活细胞及死细胞数，按照公式计算：细胞数/ml=4个大方格活细胞总数/4×10^4×稀释倍数；细胞存活率（%）=活细胞总数/（活细胞+死细胞总数）×100%。

1.4 Western blot检测β-arrestin1、JNK蛋白及磷酸化

离心收集3×10^6细胞，PBS洗涤1次，加入200 μl RIPA裂解液，冰上裂解30 min，每间隔5 min震荡混匀1次。4 ℃，12 000 r/min离心20 min，保留上清。用BCA法检测蛋白浓度，随后按照4∶1比例在蛋白液中加入5×上样缓冲液后煮沸5 min，取20 μg蛋白电泳，转膜，5%脱脂奶粉室温封闭1 h，加入一抗（β-arrestin1，总JNK，p-JNK，β-actin），4 ℃孵育过夜，次日加入二抗室温孵育1 h，TBST充分洗涤后，用增强化学发光系统（ECL）检测膜上信号。

1.5 免疫共沉淀实验检测β-arrestin1与Src结合

提取细胞蛋白方法同前。每500 μl总蛋白中加入2 μg anti-β-arr1或anti-Src抗体，4 ℃缓慢摇动，抗原抗体混合过夜，准备蛋白A/G琼脂糖珠，用PBS洗涤珠子3次，3000 r/min 2 min/次，每500 μl蛋白中加入30 μl珠子，4 ℃缓慢摇动抗原抗体混合物4 h。将抗原抗体复合物3000 r/min离心3 min，收集琼脂糖珠-抗原抗体复合物，弃上清，用预冷PBS洗3次，吸尽上清，加入50 μl 1×上样缓冲液将琼脂糖-抗原抗体复合物重悬与混匀。将样本煮5 min后离心，上清PAGE电泳与Western Blot。以IgG作为两蛋白分子结合的阴性对照。

将细胞分为两组，其中一组加入Saracatinib 5 μmol/L，另外一组为空白对照对照加入等体积DMSO，培养24 h后收集细胞提取蛋白做Co-IP。

1.6 JNK抑制剂SP600125、MEK抑制剂PD98059及Src抑制剂Saracatinib分别对p-JNK的影响

将K562-Ctrl细胞10%完全培养基替换为0.5%培养基，37 ℃含5% CO_2培养箱中静置培养24 h。将细胞分为3组，参考文献使用浓度[11-12]两组中分别加入SP600125 10 μmol/L及PD98059 50 μmol/L，另外一组为空白对照加入等体积DMSO，培养24 h后收集细胞提取蛋白质做Western blot。

1.7 JNK抑制剂SP600125对K562细胞增殖的影响

取对数期K562-Ctrl细胞96孔板铺板，同上设3组铺5板，检测细胞增殖情况，方法同1.3。

1.8 统计学处理

实验结果采用SPSS17.0统计软件进行分析，组间两两比较，方差齐性采用单因素方差分析，方差不齐时采用秩和分析，$P<0.05$时认为有统计学差异。

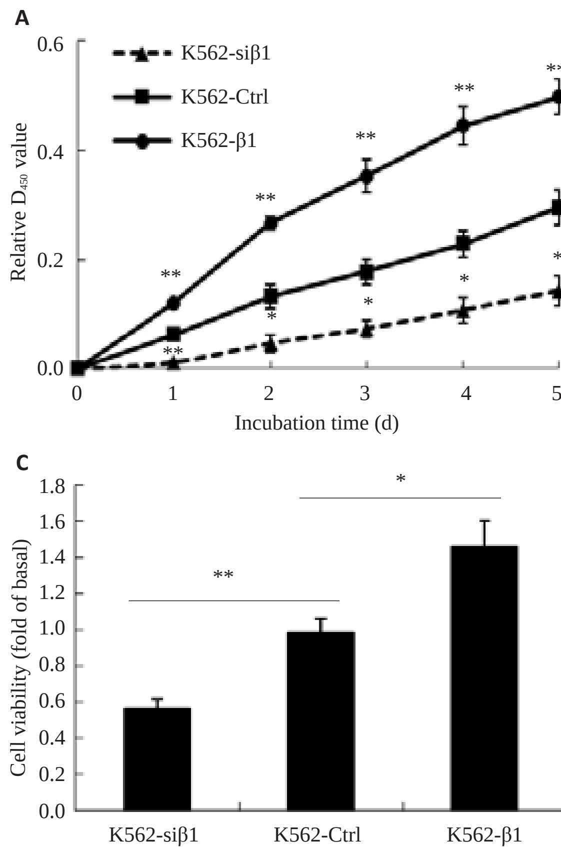
2 结果

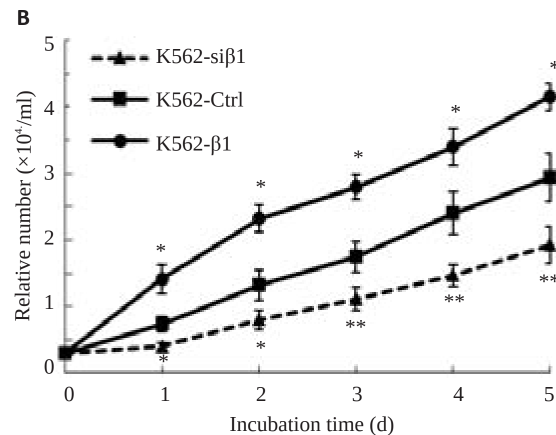
2.1 β-Arrestin1促进CML K562细胞增殖

用CCK-8实验连续监测5 d K562-Ctrl，K562-siβ1和K562-β1的D_{450}值，结果显示K562-siβ1细胞中D_{450}值从第1天到第5天显著低于K562-Ctrl细胞，而K562-β1从第1天到第5天D_{450}值显著高于K562-Ctrl细胞。细胞计数显示K562-siβ1细胞较K562-Ctrl细胞存活率增加，而K562-Ctrl细胞又较K562-β1细胞存活率高（$P<0.05$，图1）。

2.2 β-Arrestin1促进JNK磷酸化

Western Blot结果显示，在β-Arrestin1干预K562细胞中总JNK表达不受影响，但磷酸化JNK（p-JNK）表达却与β-Arrestin1表达成正相关（图2A）。为进一步探寻K562细胞增殖与JNK通路的关系，选用了JNK选择





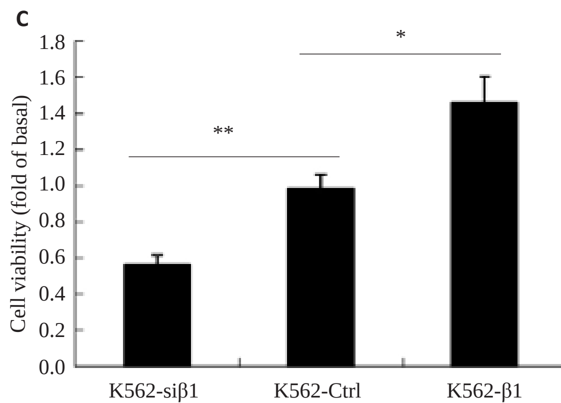


图1 β-arrestin1促进CML K562细胞增殖

Fig.1 β-arrestin1 promotes the cell proliferation of K562 cells. ***A***: Proliferation of different K562 cell lines assessed with CCK8 assay; ***B***: Viable cell number of different K562 cell lines; ***C***: Viability of different K562 cells at 48 h. **P*<0.05, ***P*<0.01. K562-siβ1 *vs* K562-Ctrl, **P*<0.05; K562-β1 *vs* K562-Ctrl, ***P*<0.05.

性抑制剂SP600125及MEK抑制剂PD98059，Western Blot显示SP600125能够特异地抑制JNK磷酸化，PD98059可作为阴性对照(图2B)。

2.3 β-Arrestin1与Src结合，Src抑制剂抑制JNK磷酸化

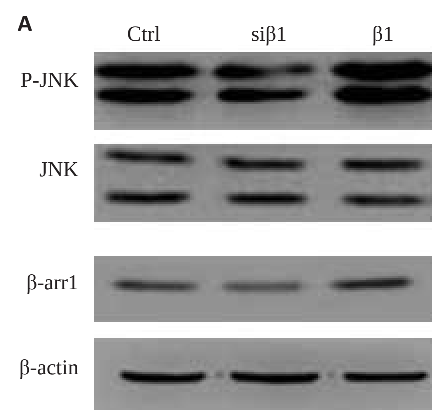
Co-IP实验结果显示在K562细胞中，β-Arrestin1能够与Src结合(图3A)。加入Src抑制剂Saracatinib，结果显示β-Arrestin1与Src结合减少(图3B)。Western Blot结果显示，加入Src抑制剂后，p-JNK表达减少，β-Arrestin1无明显变化(图3C)。

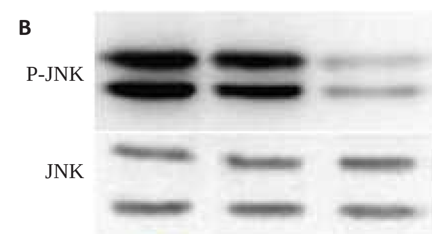
2.4 SP600125抑制K562细胞增殖

通过检测SP600125与PD98059处理后的K562细胞增殖情况，发现PD98059处理后的细胞增殖能力与生存率没有明显的改变，而SP600125处理后的细胞增殖能力与生存率明显下降(图4，*P*<0.05)。

3 讨论

β-arrestins是一类在β肾上腺素受体激酶(βARK)提纯过程中发现[13]的重要支架蛋白[14]和信号调控因子[15]。Arrestins蛋白广泛存在于细胞内，且对绝大多数受G蛋白偶联受体(GPCR)调控的细胞信号通路起重要作用[16-17]。本研究利用β-arrestin1慢病毒载体构建的CML稳定K562细胞为研究对象，细胞增殖实验结果提示β-arrestin1能明显促进K562细胞增殖，与前期研究发现结果一致。





K562-Ctrl	+	+	+
PD98059	-	+	-
Sp600125	-	-	-
DMSO	+	-	-

图2 β-arrestin1促进JNK磷酸化

Fig.2 β-arrestin1 promotes JNK activation. ***A***: Western blot results for β-arrestin1, JNK and p-JNK in different K562 cells. ***B***: Western blot results for JNK and p-JNK after treatment with PD98059 and SP600125.

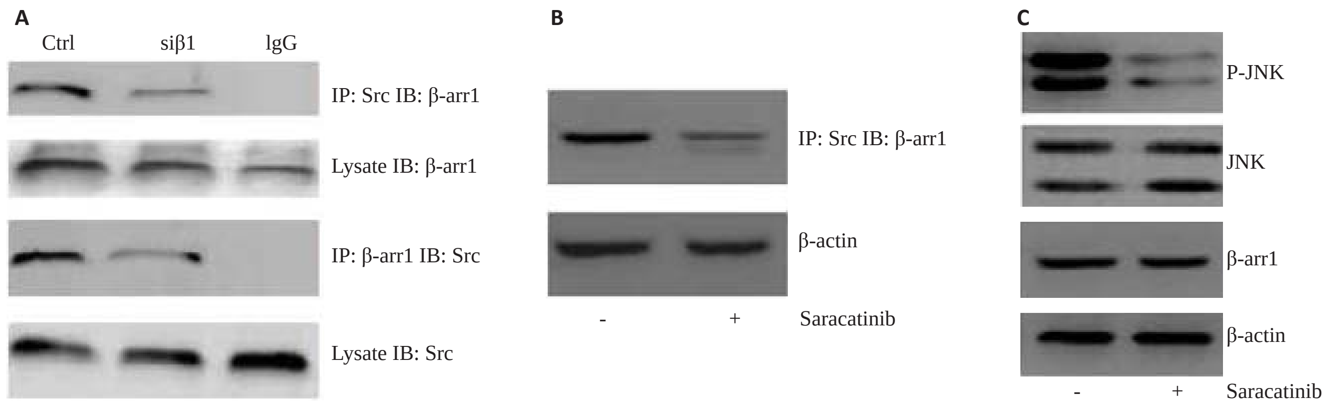


图3 Src参与β-arrestin1诱导的JNK磷酸化

Fig.3 Src is involved in β-arrestin1-induced JNK phosphorylation. ***A***: Co-IP results for β-arrestin1 and Src in K562 cells; ***B***: Co-IP results for β-arrestin1 and Src after treatment with Src inhibitor Saracatinib; ***C***: Western blot results for β-arrestin1, JNK and p-JNK after treatment with inhibitor Saracatinib.

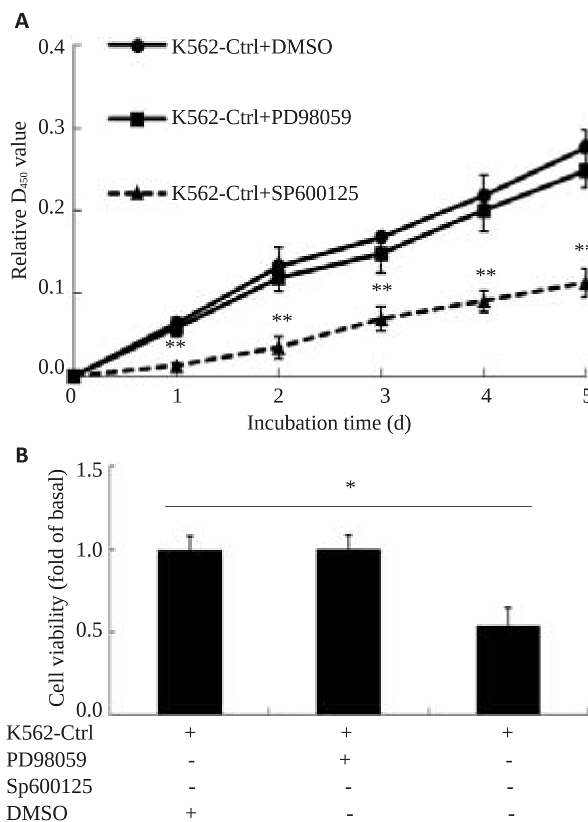


图4 JNK抑制剂SP600125特异下调K562细胞增殖

Fig.4 SP600125 specifically suppresses proliferation in K562 cells. ***A***: CCK8 assay of K562 cells treated with PD98059, SP600125, and DMSO; ***B***: Viability of K562 cells treated with PD98059 and SP600125 for 24 h. *P<0.05, **P<0.01.

肿瘤的发生是多因素、多机制参与的结果,其过程涉及到一系列信号传导分子的改变。随着各信号通路的作用被深入地研究,人们对肿瘤的认知愈加深入进而发现新的药物治疗靶点。细胞增殖是肿瘤形成的重要过程之一,可受多种信号通路调节。我们在检测β-arrstin1对细胞增殖相关通路激活的影响时发现,β-arrstin1特异促进JNK信号通路激活,在应用JNK选择性抑制剂SP600125后发现,JNK信号通路的激活参与K562细胞增殖。

c-Jun氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK),是哺乳类细胞中MAPK的一亚类,在细胞发育、凋亡、生长及免疫应答等多细胞生物过程中发挥重要作用[18]。JNK/SAPK信号通路可被应激刺激、细胞因子、表皮生长因子及G蛋白偶联受体激活[19]。Src蛋白是Src家族激酶的成员之一,研究表明,在氧化应激,尤其在有ROS参与的应激过程中,Src可能是JNK信号通路途径的重要因子[20-21]。同时在功能结构域上,β-arrestin的N-端包含Src-SH3结合位点[22],C-端包含JNK3结合位点,调控GPCR信号通路和MAPK信号通路。其中部分MAPK信号通路中信号的传递涉及β-arrestin依赖型Src募集[23-24],Co-IP实验证明在K562细胞中β-arrstin1可与Src结合。以上结果提示,β-arrstin1可能通过招募Src进而促进JNK信号通路的激活。在应用Src抑制剂Saracatinib后我们发现β-arrstin1与Src结合以及p-JNK表达减少,而β-arrstin1表达无明显变化。实验结果表明Src确实参与了β-arrstin1诱导的JNK磷酸化。

综上所述,本文发现在CML细胞中β-arrestin1通过结合Src促进JNK信号通路的激活,进而促进CML K562细胞增殖,但其确切的机制有待进一步研究。本文中β-arrestin1对JNK信号通路的作用,为发现CML新的药物治疗靶点奠定了理论基础。

参考文献:

[1] Rowley JD. Letter: a new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining[J]. Nature, 1973, 243: 290-3.

[2] Sinclair A, Latif AL, Holyoake TL. Targeting survival pathways in chronic myeloid leukaemia stem cells[J]. Br J Pharmacol, 2013, 169 (8): 1693-707.

[3] Lefkowitz RJ, Whalen EJ. Beta-arrestins: traffic cops of cell signaling[J]. Curr Opin Cell Biol, 2004, 16(2): 162-8.

[4] Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E. Epigenetics: a landscape takes shape[J]. Cell, 2007, 128(4): 635-8.

[5] Di W, Wu J. Involvement of b-arrestins in cancer progression[J]. Mol Biol Rep, 2013, 40(2): 1065-71.

[6] Mcdonald PH, Chow CW, Miller WE, et al. beta-Arrestin 2: A receptor-regulated MAPK scaffold for the activation of JNK3[J]. Science, 2000, 290(5496): 1574-7.

[7] Luttrell LM, Roudabush FL, Choy EW, et al. Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestin scaffolds[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(5): 2449-54.

[8] Bruchas MR, Macey TA, Lowe JD, et al. Kappa opioid receptor activation of p38 MAPK is GRK3-and arrestin-dependent in neurons and astrocytes[J]. J Biol Chem, 2006, 281(26): 18081-9.

[9] 刘 慧, 龙 娟, 谭俊杰, 等. β-arrestin1和β-arrestin2在白血病中的表达及意义[J]. 解放军医学杂志, 2010, 35(2): 177-81.

[10] Li K, Qi X. b-Arrestin1 promotes the progression ofchronic myeloid leukaemia by regulatingBCR/ABL H4 acetylation[J]. Br J Cancer, 2014, 111(3): 568-76.

[11] Sasaki DT, Murray BW. SP600125,an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(24): 13681-6.

[12] Cuenda A, Cohen P. PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and *in vivo*[J]. J Biol Chem, 1995, 270(46): 27489-94.

[13] Benovic JL, Kühn H, Weyand I, et al. Functional desensitization of the isolated beta-adrenergic receptor by the beta-adrenergic receptor kinase: potential role of an analog of the retinal protein arrestin (48-kDa protein) [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1987, 84(24): 8879-82.

[14] Morrison DK, Davis RJ. Regulation of map kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals[J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2003, 19(3): 91-118.

[15] Downward J. The ins and outs of signaling[J]. Nature, 2001, 411 (6839): 759-62.

[16] Shenoy SK. Transduction of receptor signals by beta-arrestins[J]. Science, 2005, 308(3): 512-7.

[17] Lefkowitz RJ. GRKs and beta-arrestins:roles in receptor silencing, trafficking and signaling[J]. Trends Endocrinol Metab, 2006, 17(2): 159-65.

[18] davis RJ. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases[J]. Cell, 2000, 103(1): 239-52.

[19] Karin M, Gallagher E. From JNK to pay dirt: jun kinases, their biochemistry, physiology and clinical importance[J]. IUBMB Life, 2005, 57(4/5): 283-95.

[20] Abe J, Haendeler J. Src and Cas mediate JNK activation but not ERK1/2 and p38 kinases by reactive Oxygen species[J]. J Biol Chem, 2000, 275(16): 11706-12.

[21] Vita JA, Berk BC. c-Jun n-terminal kinase activation by Hydrogen peroxide in endothelial cells involves SRC-dependent epidermal growth factor receptor transactivation[J]. J Biol Chem, 2001, 276 (19): 16045-50.

[22] Luttrell LM, Ferguson SS, Daaka Y, et al. Beta-arrestin-dependent formation of beta(2) adrenergic receptor Src protein kinase complexes[J]. Science, 1999, 283(542): 655-61.

[23] Zalevsky J, Thoma MS. β-arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2[J]. Cell Biol.2000b, 148(6): 1267-81.

[24] Andrews JD, Kelvin AA. Regulation of tyrosine kinase activation and granule release through β-arrestin by CXCRI[J]. Nat Immunol, 2000, 1(3): 227-33.

（编辑：孙昌朋）